

Resumo 42 - IDENTIFICAÇÃO DE *Staphylococcus aureus* UTILIZANDO A TÉCNICA DE PCR EM TEMPO-REAL EM CASOS DE MASTITE SUBCLÍNICA CAPRINA.

IDENTIFICATION OF Staphylococcus aureus USING THE REAL-TIME PCR FROM CASES SUBCLINICAL MASTITIS IN GOATS.

Darciane Rodrigues Fernandes¹; Viviane Maria Dias Costa²; Liana Maria Ferreira Silva³; Jéssica Maria Leite dos Santos⁴; Raymundo Rizaldo Pinheiro⁵; Jomar Patrício Monteiro⁶; Viviane de Souza⁷

¹Graduanda em Tecnologia em Alimentos - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, IFCE – Sobral – CE, Bolsista PIBIC/CNPq/EMBRAPA. E-mail:darciane_rodrigues@hotmail.com ²Graduanda em Medicina Veterinária - Instituto Superior de Teologia Aplicada – Sobral – CE, Bolsista BICT/FUNCAP/Embrapa. ³Assistente A da Embrapa Caprinos e Ovinos – Sobral-CE. ⁴Méd. Vet., M.Sc., Doutoranda da UECE, Fortaleza-CE. ⁵Méd. Vet., D.SC., Pesquisador da Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral-CE. ⁶Biólogo, PhD., Pesquisador da Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral-CE. ⁷Méd. Vet., D.Sc., Pesquisadora da Embrapa Caprinos e Ovinos, Fazenda Três Lagoas, Estrada Sobral/Groaíras, Km 04, CEP - 62010-970, C. Postal 145, Sobral-CE

Introdução: A mastite caracteriza-se por um processo inflamatório da glândula mamária sendo na maioria das vezes de origem infecciosa, podendo ser classificada quanto à magnitude do processo inflamatório, em mastite clínica e subclínica. A mastite clínica caracteriza-se por modificações visíveis no leite e, muitas vezes, alterações na glândula mamária como aumento de volume, presença de dor, aumento de temperatura e rubor, enquanto que na mastite subclínica, não há sinais visíveis da inflamação. O leite tem seu aspecto macroscópico normal, sendo possível sua identificação somente por testes laboratoriais com o leite. Espécies de estafilococos coagulase-negativos (ECN) estão sendo identificadas com maior frequência nos casos de mastite subclínica em caprinos. Porém, estafilococos coagulase-positivos (ECP), como o *Staphylococcus aureus* são de extrema importância quando relacionadas à saúde pública, uma vez que as suas enterotoxinas podem estar presentes no leite e/ou derivados, permanecendo estáveis e causando intoxicação alimentar. A caracterização molecular é ferramenta importante no diagnóstico desses micro-organismos, por apresentar elevada sensibilidade e especificidade, fornecendo subsídios a estudos epidemiológicos que permitirão a rastreabilidade de tais patógenos ao longo da cadeia produtiva do leite. Diante do exposto, objetivou-se com o presente estudo conhecer as características fenotípicas e genotípicas das estirpes de *S. aureus* isoladas das amostras de leite de cabra.

Material e Métodos: No período de junho a julho de 2014 foram colhidas 240 amostras de leite das metades mamárias de 30 cabras da raça Saanen e Anglo Nubiana pertencentes ao rebanho da Embrapa Caprinos e Ovinos. Após a limpeza do óstio papilar com álcool etílico 70% (v/v) foram colhidas, cerca de 2 a 5 mL de leite, de cada metade mamária, antes do início da ordenha. As amostras foram acondicionadas em material isotérmico contendo gelo e levadas para isolamento e identificação de *Staphylococcus* spp. no Laboratório de Microbiologia da Embrapa Caprinos e Ovinos. Após crescimento em placa com ágar Baird-Parker, 3 a 5 colônias foram selecionadas para cultivo em ágar nutriente inclinado por 24 horas a 37°C. Em seguida, foram preparados esfregaços pelo método de Gram e as culturas que se apresentaram em forma de cocos Gram-positivos agrupados no formato “cacho de uva” foram submetidas às provas de catalase, coagulase livre e produção de acetoina (VP). Para a extração de DNA das estirpes isoladas foi utilizado o Kit Invitek®, – Extração de Material Genômico, que contém o protocolo de extração de DNA para bactérias Gram-positivas, as soluções de lise, de extração e de lavagem e colunas de purificação, conforme instruções do fabricante. A confirmação molecular dos isolados de *S. aureus*, para a identificação da espécie, foi realizada a partir da amplificação de fragmentos de 108 bp de DNA

cromossômico específico do *S. aureus* de acordo com o protocolo descrito por Martineau et al. (1) com adaptações para PCR quantitativo.

Resultados e Discussão: Das 240 amostras analisadas, observou-se a multiplicação bacteriana em 104, sendo que bioquimicamente foram identificados 95 estirpes de ECN e 9 estirpes de ECP. Pela técnica de PCR quantitativo, confirmou-se 28 estirpes de *S.aureus* e 76 estirpes de ECN. Houve a confirmação de 19 estirpes de *S.aureus* que deram negativos ao teste bioquímico, a qual pode ser justificada pela capacidade da técnica de PCR quantitativo detectar micro-organismos mesmo em pequenas quantidades, oferecendo resultados rápidos e confiáveis. Observou-se um maior isolamento de ECN envolvidos em casos de mastite subclínica caprina. ECN podem causar infecções persistentes, as quais resultam em maiores CCS, apresentando como principal consequência a redução da qualidade do leite.

Conclusões: Tais achados reforçam que a técnica de PCR quantitativo oferece maior poder discriminatório na identificação de *Staphylococcus aureus*, já que é baseado nas características genotípicas, além de oferecer resultados mais rápidos. Concluiu-se também que a partir das características fenotípicas, ou seja, pelos testes bioquímicos, não é possível a diferenciação exata entre as estirpes de *Staphylococcus* spp., pois os testes possuem menor sensibilidade e especificidade, apresentando aspectos que dificultam a interpretação e classificação das estirpes.

Agradecimentos: Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FUNCAP; Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa (CNPq); Embrapa.

Referências:

1. Martineau F, Picard FJ, Roy PH, Ouellette M, Bergeron, MG. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. Journal of Clinical Microbiology. 1998; 36: 618-23.